

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005824

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-096876
Filing date: 29 March 2004 (29.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月29日

出願番号
Application Number: 特願2004-096876

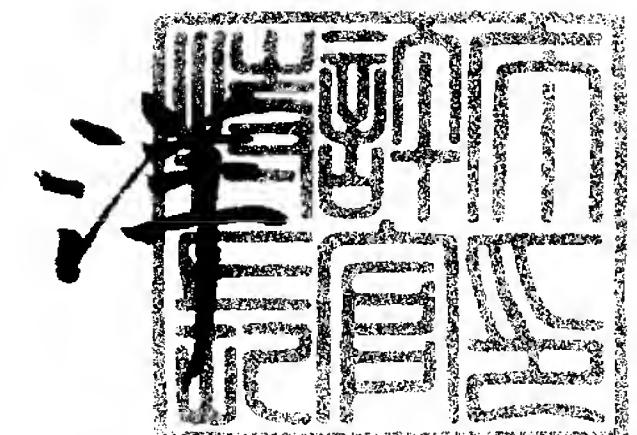
パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is
JP 2004-096876

出願人
Applicant(s): 杉山 治夫

2005年 4月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 C1-A0401
【提出日】 平成16年 3月29日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西2-19-30
【氏名】 杉山 治夫
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府吹田市豊津町1-14-1004
【氏名】 尾路 祐介
【特許出願人】
【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西2-19-30
【氏名又は名称】 杉山 治夫
【代理人】
【識別番号】 100102978
【弁理士】
【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
【識別番号】 100108774
【弁理士】
【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 041092
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

以下の（a）から（c）のいずれかを有効成分として含有する細胞増殖抑制剤。

（a）WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA

（b）（a）の二重鎖RNAをコードするDNA

（c）（b）のDNAが挿入されたベクター

【請求項 2】

二重鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物の17AA部位に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。

【請求項 3】

二重鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物の17AA部位に存在する配列番号：1に記載の塩基配列に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。

【請求項 4】

二重鎖RNAが配列番号：1に記載の塩基配列と配列番号：2に記載の塩基配列との対合を含む、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】WT1遺伝子の発現を抑制するsiRNAおよびその利用

【技術分野】

【0001】

本発明は、WT1遺伝子の発現を抑制するsiRNAおよびその利用に関する。特に本発明は、該siRNAを利用した細胞増殖の抑制に関する。

【背景技術】

【0002】

ウイルムス腫瘍遺伝子(WT1遺伝子)は、ジンクフィンガー型の転写因子をコードする遺伝子である。WT1は、WT1遺伝子に存在する2か所のalternative splicing部位のうちの5'側の部位に挿入された17個のアミノ酸(17AA)の有無とジンクフィンガー3-4間の3アミノ酸残基の有無によって区別される、4つのアイソフォームの存在が知られている。

【0003】

ウイルムス腫瘍遺伝子(WT1遺伝子)は、小児腎腫瘍の原因遺伝子として単離された(非特許文献1、2)。ウイルムス腫瘍でこの遺伝子の欠損や突然変異が見つかったこと等から、従来は癌抑制遺伝子と考えられてきた。

【0004】

しかし、本発明者らによる数々の報告は、WT1遺伝子は癌抑制遺伝子というより、むしろ癌遺伝子様の機能を果たしていることを示唆している。変異のない野生型WT1遺伝子がほとんどすべての白血病細胞で高発現され、その発現レベルは白血病患者の予後と逆相関を示すこと(非特許文献3、4)、WT1アンチセンスDNAにより白血病細胞の増殖が特異的に抑制されること(非特許文献5)、マウス正常骨髄系前駆細胞および骨髄系前駆細胞株32D C13はWT1遺伝子の強制発現により好中球への分化が抑制され、増殖するようになること(非特許文献6)、等が明らかとなった。これらの知見は、WT1遺伝子は、造血系細胞の白血病化に関与していることを示すものである。また本発明者らは、野生型WT1遺伝子が種々の固体癌においても高発現していることを報告してきた(非特許文献7-14)。

【0005】

そこで本発明者らは、WT1遺伝子の発現を効率よく抑制することができれば、腫瘍特異的分子標的療法の開発につながると考えた。これまでに、WT1を標的とした腫瘍特異的分子標的療法の例は知られていない。

【非特許文献1】Call KM, et al : Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60 : 509, 1990

【非特許文献2】Gessler M, et al : Homozygous deletion in Wilms' tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343 : 774, 1990

【非特許文献3】Inoue K, et al : WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 84 : 3071, 1994

【非特許文献4】Inoue K, et al : Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 89 : 1405, 1997

【非特許文献5】Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, Kudoh T, Akiyama T, Murakami A, Maekawa T. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* 1996 Apr 1;87(7):2878-84.

【非特許文献6】Inoue K, et al : Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 91 : 2969, 1998

【非特許文献7】Oji, Y., Ogawa, H., Tamaki, H., Oka, Y., Tsuboi, A., Kim, E. H., Soma, T., Tatekawa, T., Kawakami, M., Asada, M., Kishimoto, T., and Sug

yama, H. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. Japanese Journal of Cancer Research, 90: 194-204, 1999.

【非特許文献8】 Oji, Y., Miyoshi, S., Maeda, H., Hayashi, S., Tamaki, H., Nakatsuka, S., Yao, M., Takahashi, E., Nakano, Y., Hirabayashi, H., Shintani, Y., Oka, Y., Tsuboi, A., Hosen, N., Asada, M., Fujioka, T., Murakami, M., Kanato, K., Motomura, M., Kim, E. H., Kawakami, M., Ikegami, K., Ogawa, H., Aozasa, K., Kawase, I., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. International Journal of Cancer, 100: 304-308, 2002.

【非特許文献9】 Ueda, T., Oji, Y., Naka, N., Nakano, Y., Takahashi, E., Koga, S., Asada, M., Ikeba, A., Nakatsuka, S., Abeno, S., Hosen, N., Tomita, Y., Aozasa, K., Tamai, N., Myoui, A., Yoshikawa, H., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. Cancer Science, 94: 271-276, 2003.

【非特許文献10】 Oji, Y., Inohara, H., Nakazawa, M., Nakano, Y., Akahani, S., Nakatsuka, S., Koga, S., Abeno, S., Honjo, Y., Yamamoto, Y., Iwai, S., Yoshida, K., Oka, Y., Ogawa, H., Yoshida, J., Aozasa, K., Kubo, T., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Science, 94: 523-529, 2003.

【非特許文献11】 Oji, Y., Miyoshi, Y., Koga, S., Nakano, Y., Ando, A., Nakatsuka, S., Ikeba, A., Takahashi, E., Sakaguchi, N., Yokota, A., Hosen, N., Ikegami, K., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Ogawa, H., Aozasa, K., Noguchi, S., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary thyroid cancer. Cancer Science, 94: 606-611, 2003.

【非特許文献12】 Oji, Y., Yamamoto, H., Nomura, M., Nakano, Y., Ikeba, A., Nakatsuka, S., Abeno, S., Kiyotoh, E., Jomgeow, T., Sekimoto, M., Nezu, R., Yoshikawa, Y., Inoue, Y., Hosen, N., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Ogawa, H., Souda, S., Aozasa, K., Monden, M., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. Cancer Science, 94: 712-717, 2003.

【非特許文献13】 Oji, Y., Miyoshi, S., Takahashi, E., Koga, S., Nakano, Y., Shintani, Y., Hirabayashi, H., Matsumura, A., Iuchi, K., Ito, K., Kishimoto, Y., Tsuboi, A., Ikegami, K., Hosen, N., Oka, Y., Ogawa, H., Maeda, H., Hayashi, S., Kawase, I., and Sugiyama, H. Absence of mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in de novo non-small cell lung cancers. Neoplasma, in press.

【非特許文献14】 Oji, Y., Miyoshi, Y., Kiyotoh, E., Koga, S., Nakano, Y., Ando, A., Hosen, N., Tsuboi, A., Kawakami, M., Ikegami, K., Oka, Y., Ogawa, H., Noguchi, S., and Sugiyama, H. Absence of mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in primary breast cancer. Jpn J Clin Oncol, in press.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、WT1遺伝子の発現を効率的に抑制することができる分子を提供すると共に、該分子を利用して細胞増殖を抑制することを課題とする。WT1遺伝子の発現を抑制する分子として、特に本発明は、siRNAを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、近年遺伝子発現抑制の手段として注目されているsiRNAを癌細胞内で発現させるベクターを用いてWT1の発現を抑制することを考えた。試

行錯誤の結果、本発明者らはWT1遺伝子の17AA部位を標的とするsiRNAがWT1遺伝子の発現を抑制するのみならず、顕著に癌細胞株の細胞増殖抑制効果を示すことを見出した。すなわち、本発明はWT1を標的とするRNAi効果を利用した細胞増殖抑制に関し、より具体的には、下記の発明を提供するものである。

【0008】

- 【1】以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する細胞増殖抑制剤
 - (a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA
 - (b) (a)の二重鎖RNAをコードするDNA
 - (c) (b)のDNAが挿入されたベクター
- 【2】二重鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物の17AA部位に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む、【1】に記載の細胞増殖抑制剤
- 【3】二重鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物の17AA部位に存在する配列番号：1に記載の塩基配列に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む、【1】に記載の細胞増殖抑制剤
- 【4】二重鎖RNAが配列番号：1に記載の塩基配列と配列番号：2に記載の塩基配列との対合を含む、【1】に記載の細胞増殖抑制剤

【発明の効果】

【0009】

本発明によって、WT1遺伝子の発現を効率的に抑制することができるsiRNAおよび該siRNAを有効成分とする細胞増殖抑制剤が提供された。WT1遺伝子は、癌細胞に高発現することが知られていることから、本発明の細胞増殖抑制剤は、新規抗癌剤として特に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明のsiRNAは、標的であるWT1遺伝子の転写産物と相補的なRNA（アンチセンスRNA鎖）および該RNAに相補的なRNA（センスRNA鎖）が結合した二重鎖RNAである。本発明のsiRNAの標的となるWT1遺伝子の転写産物の配列としては、siRNAがRNAi効果を示しうる限り特に制限はない。好ましくは、WT1遺伝子の転写産物の17AA部位に存在する配列である。本発明において「17AA部位」とは、WT1遺伝子の転写産物の配列中、WT1遺伝子に存在する2か所のalternative splicing部位のうちの5'側の部位で17個のアミノ酸に相当する部位をさす。このような標的の配列の具体的な例として、配列番号：1の配列を挙げることができる。本実施例において用いた、WT1遺伝子の転写産物の17AA部位に対するsiRNAのセンス鎖の塩基配列を配列番号：1に、アンチセンス鎖の塩基配列を配列番号：2に示した。本発明のsiRNAは、配列番号：1の塩基配列と配列番号：2の塩基配列の対合を含むものであることが特に好ましい。

【0011】

siRNAは、細胞内で毒性を示さない範囲の短鎖からなる二重鎖RNAを意味し、毒性を示さない範囲の長さであれば特に限定はなく、例えば、15～49塩基対と、好適には15～30塩基対とすることができます。

【0012】

dsRNAにおけるRNA同士が対合した二重鎖RNAの部分は、完全に対合しているものに限らず、ミスマッチ（対応する塩基が相補的でない）、バルジ（一方の鎖に対応する塩基がない）などにより不対合部分が含まれていてもよい。

【0013】

本発明のsiRNAの末端構造は、WT1遺伝子の発現をRNAi効果により抑制し得るものであれば、平滑末端あるいは粘着（突出）末端のいずれでもよい。また、粘着（突出）末端構造は、3'末端側が突出している構造だけでなく、上記RNAi効果を誘導し得る限り5'末端側が突出している構造も含めることができる。また、突出する塩基数は、すでに報告がある2, 3塩基に限定されず、RNAi効果を誘導し得る塩基数とすることができる。例えば、この塩基数としては、1～8塩基、好適には、2～4塩基とすることができます。また、この突出している配列部分は、WT1遺伝子の転写産物との特異性が低いため、標的であるWT1遺伝子転

写物の配列と相補的（アンチセンス）配列あるいは同じ（センス）配列である必要は必ずしもない。

【0014】

本発明のsiRNAは、WT1遺伝子、好ましくは17AA(+)アイソフォームの塩基配列を基に標的となる配列を選択し、調製することができる。17AA(+)アイソフォームとは、上述の17AAを有するアイソフォームをいう。本発明者らは、WT1の4種のアイソフォームのうち17AA(+)が癌遺伝子様機能を担っていることを明らかにしてきた（非特許文献6、非特許文献7）。調製は例えは、WT1遺伝子塩基配列に基づき、標的配列として転写産物であるmRNAの連続する領域、好ましくは17AA部位の領域の配列を選択する。選択した領域に対応する二重鎖RNAを、化学的in vitro合成系、ファージRNAポリメラーゼを用いたin vitro転写法、クローン化cDNAをもとに転写・会合した長いdsRNAをRNaseIIIまたはDicerによって切断する方法等によって、適宜調製することができる。実施例で使用したヒトWT1遺伝子のcDNA配列を配列番号6に示す。該WT1遺伝子の17AA部位は、配列番号6に示した配列の第1137位から第1187位である。該WT1遺伝子は、NCBI GEN BANK NM-024426に登録されている。

【0015】

本発明のsiRNAは、上記アンチセンスRNA鎖をコードするDNA（以下、アンチセンスコードDNA）および上記センスRNA鎖をコードするDNA（以下、センスコードDNA）を用いて、細胞内で発現させることもできる（以下、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAを本発明DNAと略称する。）。上記「アンチセンスコードDNA」および「センスコードDNA」は、プロモーターと共にそのまま細胞内の染色体に導入し、細胞内でアンチセンスRNA、センスRNAを発現させsiRNAを形成させることもできるが、効率的な細胞導入などを行うために、上記siRNA発現システムをベクターに保持させることが好ましい。ここで用いることができる「ベクター」は、導入したい細胞などに対応して選択することができる。例えは、哺乳動物細胞では、例えは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、EBウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、フォーミーウイルスベクターなどのウイルスベクターやカチオニックリポソーム、リガンドDNA複合体、ジーンガンなどの非ウイルスベクターなどが挙げられるが（Y. Niitsuら, Molecular Medicine 35: 1385-1395 (1998)）、これらに限定されるものではない。また、ウイルスベクターではなく、ダンベル型DNA(Zanta M. A. et al., Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jan 5;96(1):91-6)、ヌクレアーゼ耐性を持つような修飾DNA、またはnaked plasmidもまた好適に用いることができる（Liu F, Huang L. Improving plasmid DNA-mediated liver gene transfer by prolonging its retention in the hepatic vasculature. J. Gene Med. 2001 Nov-Dec;3(6):569-76）

【0016】

本発明のsiRNAをコードするDNAを、ベクター等に保持させる場合の構成としては、同一のベクターからアンチセンスRNA鎖、センスRNA鎖を発現させる場合と、異なるベクターからそれぞれアンチセンスRNA鎖、センスRNA鎖を発現させる場合がある。例えは、同一のベクターからアンチセンスRNA鎖、センスRNA鎖を発現させる構成としては、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれpolIII系のような短いRNAを発現し得るプロモータを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを同方向にあるいは逆方向にベクターに挿入することにより構成することができる。また、異なる鎖上に対向するようにアンチセンスコードDNAとセンスコードDNAと逆向きに配置した発現システムを構成することもできる。この構成では、アンチセンスRNAコード鎖とセンスRNAコード鎖とが対となった一つの二本鎖DNA（siRNAコードDNA）が備えられ、その両側にそれぞれの鎖からアンチセンスRNA、センスRNAとを発現し得るようにプロモータを対向して備えられる。この場合には、センスRNA、アンチセンスRNAの下流に余分な配列が付加されることを避けるために、それぞれの鎖（アンチセ

ンスRNAコード鎖、センスRNAコード鎖)の3'末端にターミネーターをそれぞれ備えることが好ましい。このターミネーターは、A(アデニン)塩基を4つ以上連續させた配列などを用いることができる。また、このパリンドロームスタイルの発現システムでは、二つのプロモータの種類を異ならせることが好ましい。

【0017】

ベクターに挿入する本発明のsiRNAをコードするDNAとしては、標的配列のインバーテッドリピートの間に適当な配列(イントロン配列が望ましい)を挿入し、ヘアピン構造を持つダブルstrand RNA(self-complementary 'hairpin' RNA(hpRNA))を作るようなコンストラクト(Smith, N. A. et al. *Nature*, 407:319, 2000, Wesley, S. V. et al. *Plant J.* 27:581, 2001, Piccin, A. et al. *Nucleic Acids Res.* 29:E55, 2001)を用いることもできる。

【0018】

また、異なるベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる構成としては、例えば、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれpol III系のような短いRNAを発現し得るプロモータを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを異なるベクターに保持させることにより構成することができる。

【0019】

即ち、本発明における「siRNA(二重鎖RNA)をコードするDNA」は、siRNAの双方の鎖をコードする一つのDNAであっても、それぞれの鎖をコードする2つのDNAの組合せであってもよい。また、「siRNA(二重鎖RNA)をコードするDNAが挿入されたベクター」は、siRNAのそれぞれの鎖を2つの転写産物として発現する一つのベクターであっても、siRNAの双方の鎖を1つの転写産物として発現する一つのベクターであってもよく、また、siRNAのそれぞれの鎖を発現する2つのベクターであってもよい。

【0020】

RNAiに用いるDNAは、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上(例えば、96, 97, 98, 99%以上)の配列の同一性を有する。塩基配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990)。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえばscore = 100, word length = 12とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

【0021】

本発明のsiRNA、該siRNAをコードするDNA、該DNAが挿入されたベクターは、それぞれ、そのままあるいは適宜配合剤と混合して細胞増殖抑制剤として使用することができる。該細胞増殖抑制剤を公知トランスフェクション試薬等をもちいて細胞に導入すれば、細胞内でRNAi効果が発揮され、細胞増殖が抑制される。本発明による細胞増殖抑制剤の効果が期待される細胞は、WT1遺伝子を発現する細胞である。一例として、癌細胞を挙げることができる。より具体的には、白血病、大腸癌、肺癌、乳癌、頭頸部扁平上皮癌、食道癌、胃癌、甲状腺癌、骨および軟部肉腫、卵巣癌、子宮癌、腎癌などを例示することができる。したがって、本発明による細胞増殖抑制剤は、学術研究用としてのみならず、癌治療用医薬品、特に上記に列挙した癌を対象とする癌治療用医薬品として有効と考えられる。

【0022】

本発明の細胞増殖抑制剤を癌治療用医薬品として使用する場合は、適宜製剤化することができる。製剤化においては、薬学上許容される配合剤を混合することができる。薬学上許容される配合剤として、例えは界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体を適宜使用することができる。上記製

剤の剤型の種類としては、例えば経口剤として錠剤、粉末剤、丸剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、軟・硬カプセル剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、舌下剤、ペースト剤等、非経口剤として注射剤、坐剤、経皮剤、軟膏剤、硬膏剤、外用液剤等が挙げられ、当業者においては投与経路や投与対象等に応じた最適の剤型を選ぶことができる。また、本発明DNAを生体内に投与する場合、レトロウイルス、アデノウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターを利用することができます。投与方法としては、例えばin vivo法およびex vivo法を挙げることができる。

【実施例】

【0023】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0024】

【実施例1】WT1遺伝子mRNA 17AA部位を標的とするsiRNA発現ベクターの作製

WT1遺伝子mRNA 17AA部位を標的とするsiRNA発現ベクター作製のため、挿入するDNAを作製した。該標的部位の具体的な位置は、配列番号6に示したWT1遺伝子配列の第150位から第179位である。作製した配列を下記に示す（配列番号：3）。

5'- C CCT TCT GTC CAT TTC ACT GAG CTG GAG CT

（標的RNAのアンチセンス鎖-30mer-をコードするDNA） -

-AAAACCTCGAGAAAAA（ループシーケンスXbaIサイトを含む） -

-AG CTC CAG CTC AGT GAA ATG GAC AGA AGG G

（標的RNAのセンス鎖-30mer-をコードするDNA） -

-GGTACCCGGATATCTTTTTT-3'

【0025】

上記DNAをsiRNA発現ベクターのクローニング部位に挿入し、WR14ベクターを作製した。siRNA発現ベクターは、東京大学大学院工学系研究科 川崎広明先生から供与をうけたsiRNA発現ベクター（pPuro-tRNA-SKE vector）を使用した。pPuro-tRNA-SKE vectorの代わりに、pIGENEtRNA Pur Vector（クローンテック社）を使用することも可能である。

【0026】

また、WT1遺伝子mRNAの4種のアイソフォームの共通配列を標的とするsiRNA発現ベクターとして、WR13ベクターを作製した。WR13ベクターは、

aag gtg gct cct aag ttc atc tga ttc cag（アンチセンスRNA鎖をコードするDNA、配列番号4）

ctg gaa tca gat gaa ctt agg agc cac ctt（センスRNA鎖をコードするDNA、配列番号5）

を含む。WR13による標的部位は、配列番号6に示したWT1遺伝子配列の第1101位から1130位である。

【0027】

【実施例2】細胞培養およびsiRNA発現ベクターの導入

WT1遺伝子を高発現するFibrosarcoma cell line HT-1080細胞を10%含Dulbecco's Modified Medium(DMEM) 中で培養した。トリプシナイズしたHT-1080細胞 2×10^4 cells/2mlを6 well plateにまき、24時間後にFugene 6 (ROCHE) を用いてWR14ベクターあるいは空ベクター $2 \mu\text{g}$ をHT-1080細胞へ導入した。

【0028】

【実施例3】siRNA発現ベクターによるHT-1080細胞の増殖抑制

WR14ベクターによる細胞増殖抑制効果を検討した。ベクターを導入したHT-1080細胞を、24h、48h、または72h培養し、細胞数を算定した。細胞数の算定は、トリプシナイズした後算定板を用いて算定した。

【0029】

HT-1080細胞にWT1に対するsiRNA発現ベクターを導入するとコントロールの空ベクターを導入したときに比べ有意にHT-1080細胞の増殖を抑制した。結果を図1に示す。

【0030】

また、WRI3発現ベクターをHT-1080細胞に導入し、細胞増殖抑制効果を検討したところ、WRI4発現ベクターより弱いが、一定の細胞増殖抑制効果を確認できた。

【0031】

【実施例4】 siRNA発現ベクターによるWT117AA mRNAの発現抑制

WRI4ベクターによるWT117AA mRNAの発現抑制効果をRT-PCR法により検討した。

HT-1080細胞 2×10^4 細胞に対しWT1 17AA部位に対するRNAi発現ベクターWRI-4または空ベクター $2 \mu\text{g}$ をFugene6 (Roche)を用いてLipofectionにより細胞内に導入した。導入後96Hrで細胞を回収した。細胞をトリプシナイズしPBSにて2回洗浄後、Trizolを用いてtotal RNAを抽出し、 $2 \mu\text{g}$ のtotal RNAを錆型とし、dT primerを用いMMLV reverse transcriptase存在下でcDNAを合成した。次に、WT1の17AA部位をはさむように設計したフォワードプライマー 5' - gac ctg gaa tca gat gaa ctt ag -3' (配列番号7) 及びリバースプライマー 5' - gag aac ttt cgc tga caa gtt -3' (配列番号8) を用いてPCRを行い、そのPCR産物をagarose gel中で電気泳動を行って、WT1 17AA(+) および17AA(-) mRNAの発現について解析した。

【0032】

結果を図2に示す。WRI-4発現ベクターを導入した細胞で17AA(+) WT1 mRNAの発現の低下が認められた。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】WT1mRNAを標的とするsiRNA発現ベクターによるHT-1800細胞の増殖抑制を示す図である。

【図2】WT1mRNAを標的とするsiRNA発現ベクターによる17AA(+) WT1 mRNAの発現抑制を示す写真である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SUGIYAMA, HARUO

<120> SMALL INTERFERING RNAs TARGETING WT1 AND USES THEREOF

<130> C1-A0401

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized RNA

<400> 1

agcuccaggcu cagugaaau g gacagaagg 30

<210> 2

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized RNA

<400> 2

cccuucuguc cauuucacug agcugaggcu 30

<210> 3

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized DNA

<400> 3

cccttctgtc catttcactg agctggagct aaaaactcgag aaaaagctcc agctcagtg 60

aatggacaga agggggtaacc ccggatatct tttttt 96

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized DNA

<4 0 0> 4
a a g g t g g c t c c t a a g t t c a t c t g a t t c c a g 3 0

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized DNA

<400> 5
ctggaaatcag atgaacttag gagccacctt 30

<210> 6
<211> 3030
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
ggggtaagga gttcaaggca gcgcacac cggggggctc tccgcaaccc gaccgcctgt 60

ccgctcccc acttcccgcc ctccctccca cctactcatt caccaccca cccacccaga 120

g c c g g g a c g g c a g c c c a g g c g c c g g g c c c g c c g t c t c c t c g c c g c g a t c c t g g a c t t c 180

ctcttgctgc aggacccggc ttccacgtgt gtcccgaggc cggcggtctca gcacacgctc 240

cgctccgggc ctgggtgcct acagcagcca gagcagcagg gagtcgggaa cccgggcggc 300

atctgggcca agttaggcgc cgccgaggcc agcgctgaac gtctccaggc ccggaggagc 360

c g c g g g g c g t c c g g g t c t g a g c c g c a g c a a a t g g g c t c c g a c g t g c g g g a c c t g a a c g c g 420

ctgctgccccg ccgtccccctc cctgggtggc ggcgccggct gtgccctgcc tgtgagcggc 480

g c g g c g c a g t g g g c g c c g g t g c t g g a c t t g c g c c c c c g g g c g c t t c g g c t t a c g g g t c g 540

ttcatcaaac aggagccgag ctggggcggc gcggagccgc acgaggagca gtgcctgagc 660
gccttcactg tccacttttc cggccagttc actggcacag cggagccctg tcgctacggg 720
cccttggtc ctctccggcc cagccaggcg tcatccggcc agggcaggat gtttcctaacc 780
gcgcctacc tgcccagctg cctcgagagc cagcccgcta ttgcataatca gggttacagc 840
acggtacact tgcacggac gcccagctac ggtcacacgc cctcgaccca tggggcgccag 900
ttccccaaacc actcattcaa gcatgaggat cccatgggccc agcaggctc gctgggtgag 960
cagcagtaact cggtgccgccc cccgggtctat ggctgccaca ccccccacccga cagctgcacc 1020
ggcagccagg ctgtgtgtct gaggacgccc tacagcagtg acaatttata ccaaattgaca 1080
tcccagcttg aatgcatgac ctggaaatcag atgaacttag gagccaccctt aaaggagtt 1140
gctgctggga gctccagctc agtgaatgg acagaaggc agagcaacca cagcacagg 1200
tacgagagcg ataaccacac aacgcccata ctctgcccggag cccaaatacag aatacacaacg 1260
cacgggtgtct tcagaggcat tcaggatgtc cgacgtgtgc ctggagtagc cccgactctt 1320
gtacggtcgg catctgagac cagtggaaaa cggcccttca tgtgtgtttt cccaggctgc 1380
aataagagat atttaagct gtcccactta cagatgcaca gcaggaagca cactggtgag 1440
aaaccataacc agtgtgactt caaggactgt gaacgaaggt tttctcggtc agaccagctc 1500
aaaagacacc aaaggagaca tacagggtgtc aaaccattcc agtgtaaaac ttgtcagcga 1560
aagttctccc ggtccgacca cctgaagacc cacaccagga ctcatacagg taaaacaagt 1620
gaaaagccct tcagctgtcg gtggccaaagt tgtcagaaaa agtttgcgg gtcagatgaa 1680
ttagtcggcc atcacaacat gcatcagaga aacatgacca aactccagct ggctgtttga 1740
ggggtctccc tcggggacccg ttcaagttcc caggcagcac agtgtgtgaa ctgtttcaa 1800
gtctgactct ccactccctcc tcactaaaaa ggaaacttca gttgatcttc ttcatccaaac 1860
ttccaagaca agataccggt gcttctggaa actaccaggt gtgcctggaa gagttgggtct 1920
ctgcctgccc tacttttagt tgactcacag gcgcctggaga agcagctaacc aatgtctgg 1980
tagttaaaag cccattgcca ttgggtgtgg attttctact gtaagaagag ccatagctga 2040
tcatgtcccc ctgacccttc ccttctttt ttatgctgt ttgcgtgg gatggaattt 2100

ttgttaccatt	ttcttatcatg	gaatatttat	aggccagggc	atgtgtatgt	gtctgctaatt	2160
gtaaaactttg	tcatggtttc	catttactaa	cagcaacagc	aagaaaataaa	tcaagagagca	2220
aggcatacggg	ggtgaatctt	gtctaaccatt	cccggaggta	gccaggctgc	taacctggaa	2280
agcaggatgt	agttctgc	ggcaactttt	aaagctcatg	catttcaagc	agctgaagaa	2340
aaaatcagaa	ctaaccagta	cctctgtata	gaaatctaaa	agaattttac	cattcagtt	2400
attcaatgtg	aacactggca	cactgctctt	aagaaactat	gaagatctga	gatttttttg	2460
tgtatgtttt	tgactctttt	gagtggtaat	catatgtgtc	tttataagatg	tacataccctc	2520
cttgcacaaa	tggaggggaa	ttcattttca	tcactgggag	tgtccttagt	gtataaaaaac	2580
catgctggta	tatggcttca	agttgtaaaa	atgaaagtga	ctttaaaaaga	aaatagggga	2640
tggtccagga	tctccactga	taagactgtt	tttaagtaac	ttaaggac	ttgggtctac	2700
aagtatatgt	gaaaaaaaaatg	agacttactg	ggtgagggaaa	tccattgttt	aaagatggtc	2760
gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgttg	tgttgtgttt	tgttttttaa	gggagggaaat	2820
ttattatata	ccgttgcttg	aaattactgt	gtaaatata	gtctgataat	gatttgctct	2880
ttgacaacta	aaatttaggac	tgtataagta	ctagatgc	cactgggtgt	tgatcttaca	2940
agatattgat	gataaacactt	aaaattgtaa	cctgcatttt	tcactttgct	ctcaataaa	3000
gtctattcaa	aaggaaaaaa	aaaaaaaaaa				3030

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 7
gacctggaat cagatgaact tag 23

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

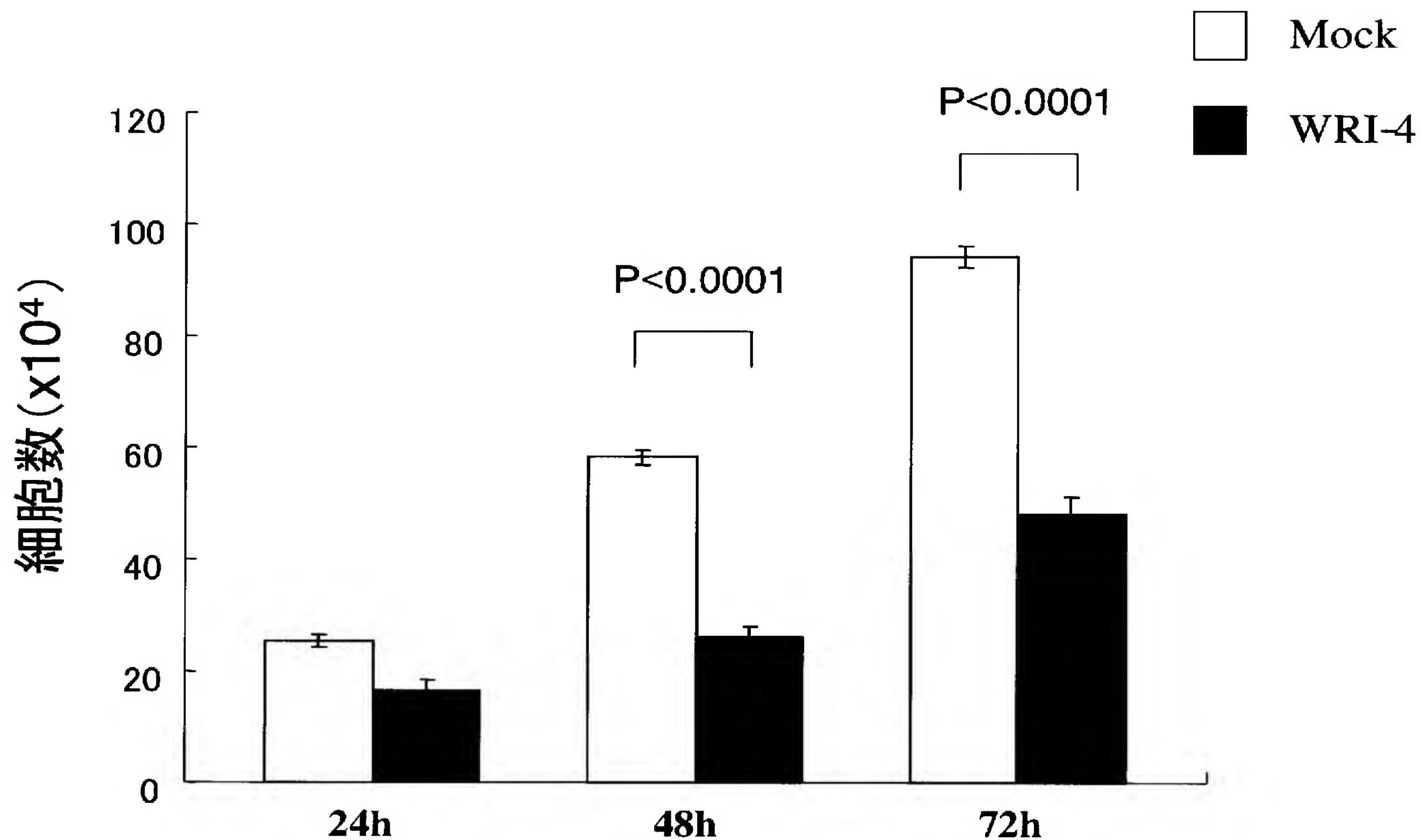
<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

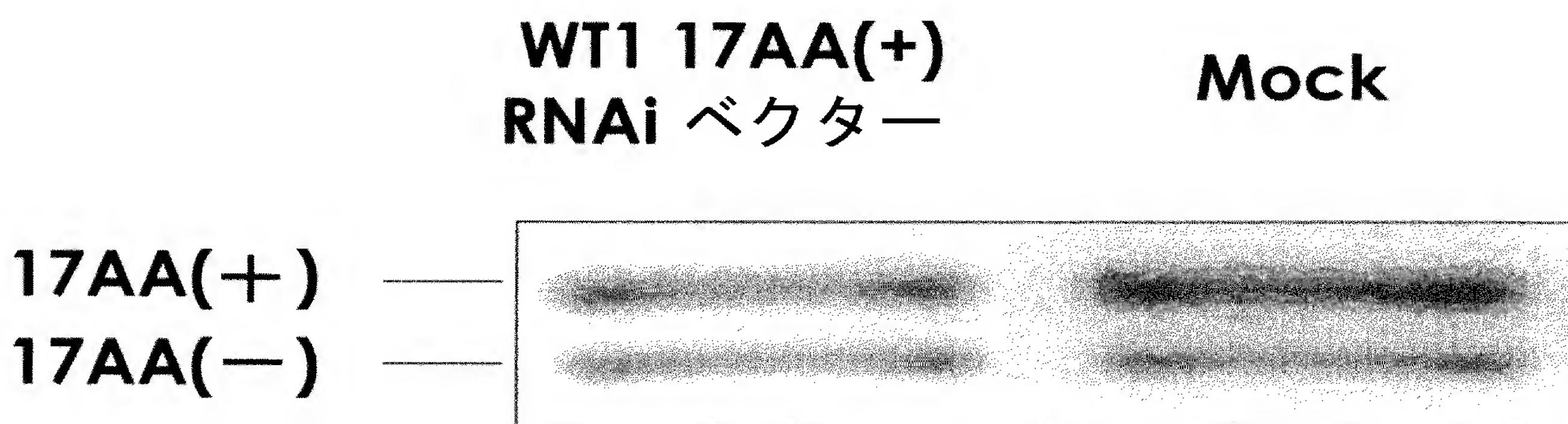
<400> 8

g a g a a c t t t c g c t g a c a a g t t 21

【書類名】 図面
【図 1】



【図 2】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 WT1遺伝子の発現を効率的に抑制することができる分子を提供すると併に、該分子を利用して細胞増殖を抑制することを課題とする。

【解決手段】 WT1遺伝子の17AA部位を標的とするsiRNAがWT1遺伝子の発現を抑制するのみならず、顕著に癌細胞株の細胞増殖抑制効果を示すことを見出した。

【選択図】 なし

出願人履歴

5 9 5 0 9 0 3 9 2

19950601

新規登録

大阪府箕面市船場西 2-19-30

杉山 治夫